

周杰,李敬东,权刚,等. 转录因子 YY1 上调 PD-L1 表达促进胆囊癌免疫逃逸的作用研究[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(10): 30-36,120.

Zhou J, Li JD, Quan G, et al. Role of transcription factor YY1 upregulating the expression of PD-L1 in promoting immune escape of gallbladder cancer [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(10): 30-36,120.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.10.005

## 转录因子 YY1 上调 PD-L1 表达促进胆囊癌 免疫逃逸的作用研究

周杰,李敬东\*,权刚,孙骥

(川北医学院附属医院肝胆外科/川北医学院肝胆胰肠研究所,四川南充 637000)

**【摘要】** 目的 研究转录因子阴阳 1(Yin-Yang1, YY1)上调程序性死亡分子配体 1(PD-L1)表达促进胆囊癌免疫逃逸的作用。方法 采用免疫组化法检测胆囊癌组织、癌旁组织、正常胆囊组织中 YY1 蛋白表达水平,体外培养正常人胆囊上皮细胞系 HGBEC 和人胆囊癌细胞系 GBC-SD、SGC-996、IH-GB1,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法测定各细胞中 YY1 水平;YY1 siRNA-1675 转染 GBC-SD 细胞。实验分为 BC 组、YY1 siRNA NC 组、YY1 siRNA-1675 组。流式细胞仪测定 PD-L1、CD69、CD25 水平及人 T 淋巴细胞凋亡率;酶联免疫吸附法(ELISA)测定上清液中白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-10(IL-10)、干扰素  $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )水平;PROMO 网站预测 YY1 的潜在靶基因,行双荧光素酶报告实验验证。结果 与正常组织相比,癌旁组织、胆囊癌组织中 YY1 阳性表达率显著升高( $P<0.05$ ),与癌旁组织相比,胆囊癌组织中 YY1 蛋白阳性表达率显著升高( $P<0.05$ );与人胆囊上皮 HGBEC 细胞相比,人胆囊癌 IH-GB1、SGC-996、GBC-SD 细胞中 YY1 水平显著升高( $P<0.05$ ),其中 GBC-SD 细胞中 YY1 水平最高,因此后续实验以 GBC-SD 细胞进行。与 BC 组、YY1 siRNA-NC 组相比,YY1 siRNA-1675 组 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$ 、CD69、CD25 水平显著升高( $P<0.05$ ),YY1、PD-L1 水平和人 T 淋巴细胞凋亡率明显降低( $P<0.05$ );PROMO 网站预测表明,PD-L1 是 YY1 的靶基因,双荧光素酶报告实验证明 PD-L1 是 YY1 的作用靶点。结论 下调 YY1 水平可靶向抑制 PD-L1 表达,可能通过此机制抑制胆囊癌免疫逃逸。

**【关键词】** 转录因子阴阳 1;程序性死亡分子配体 1;胆囊癌;免疫逃逸

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 10-0030-07

### Role of transcription factor YY1 upregulating the expression of PD-L1 in promoting immune escape of gallbladder cancer

ZHOU Jie, LI Jingdong\*, QUAN Gang, SUN Ji

(Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College/Institute of Hepatobiliary Pancreaticenterology, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

**【Abstract】** **Objective** To study the role of transcription factor Yin-Yang 1 (YY1) upregulating the expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) in promoting immune escape of gallbladder cancer. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression level of YY1 protein in gallbladder cancer, adjacent, and normal gallbladder tissues. The levels of YY1 were measured by Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) in normal human gallbladder epithelial cell line

**【基金项目】**四川省教育厅 2018 年度科研计划项目(18ZA0205)。

**【作者简介】**周杰(1985—),男,硕士,住院医师,研究方向:肝胆胰肿瘤免疫。E-mail:zhoujie54397@163.com

**【通信作者】**李敬东(1970—),男,博士,教授,研究方向:肝胆胰肿瘤免疫。E-mail:lijingdong358@126.com

HGBEC and human gallbladder cancer cell lines GBC-SD, SGC-996, and IH-GB1. YY1 siRNA-1675 was transfected into GBC-SD cells. The experiment included BC, YY1 siRNA NC, and YY1 siRNA-1675 groups. The levels of PD-L1, CD69, and CD25 and the apoptosis rate of human T lymphocytes were measured by flow cytometry. The levels of interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10, and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) in supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The PROMO website was used to predict the potential target genes of YY1, which were verified by dual luciferase reporter assays. **Results** Compared with normal tissues, the expression rate of YY1 in paracancerous and gallbladder cancer tissues was increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with adjacent tissues, the expression rate of YY1 protein in gallbladder cancer tissues was increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with HGBEC cells, YY1 levels in IH-GB1, SGC-996, and GBC-SD cells were significantly higher ( $P < 0.05$ ), and the level of YY1 in GBC-SD cells was the highest. Therefore, GBC-SD cells were used in subsequent experiments. Compared with BC and YY1 siRNA-NC groups, the levels of IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , CD69, and CD25 in the YY1 siRNA-1675 group were significantly higher ( $P < 0.05$ ), while the levels of YY1 and PD-L1 and the apoptosis rate of human T lymphocytes were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). The PROMO website predicted that PD-L1 was a target gene of YY1, and dual luciferase reporter assays confirmed that PD-L1 was a target gene of YY1. **Conclusions** Downregulating the level of YY1 inhibits the expression of PD-L1, which may inhibit the immune escape of gallbladder cancer.

**【Keywords】** transcription factor Yin-Yang 1; programmed death ligand 1; gallbladder cancer; immune escape

胆囊癌是发生于胆囊的恶性肿瘤,发病率位居消化系统肿瘤的第 6 位,在中国发病率为(1.00~1.30)/10 万,其恶性程度高,预后差<sup>[1-2]</sup>。最近研究表明,在恶性肿瘤发生发展进程中,人体免疫系统表现乏力,免疫细胞无法识别肿瘤细胞,此外肿瘤细胞还可分泌免疫抑制因子以破坏人体免疫系统<sup>[3-4]</sup>。因此,近几年探究肿瘤细胞如何逃避免疫系统监视成为研究热点。转录因子阴阳 1 (Yin-Yang1, YY1) 可作为核转录因子广泛表达于多种组织和细胞中,是多梳 (polycomb group, PcG) 蛋白家族的一员,参与细胞组织分化、染色质重塑、肿瘤发生发展进程<sup>[5-6]</sup>。程序性死亡分子配体 1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 又称为 CD274, 在非小细胞肺癌、结直肠癌等多种肿瘤组织中高表达且与其免疫逃逸机制密切相关<sup>[7-8]</sup>。研究发现,在胆囊癌组织中 PD-L1 高表达,是影响胆囊癌患者不良预后的独立危险因素<sup>[9]</sup>。在胆囊癌中,PD-L1 在免疫逃逸中发挥何种作用及调控机制未见相关报道,PROMO 网站预测显示,YY1 序列 3' UTR 区存在 3 个 PD-L1 结合位点,说明 PD-L1 是 YY1 的靶基因。因此本研究构建 YY1 siRNA-1675 转染的 GBC-SD 细胞进行研究,以期探究 YY1 和 PD-L1 在胆囊癌免疫逃逸的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验组织

随机选取 2017 年 7 月-2019 年 10 月在本院确

诊并行胆囊切除术的胆囊癌组织标本及对应癌旁胆囊组织标本各 40 例,所选患者在术前均未接受治疗,临床资料保存完整,患者已签署知情同意书。另随机选取同期因患胆囊结石患者行胆囊切除术的正常胆囊组织标本 20 例,患者已签署知情同意书。组织切除后,迅速将组织置于 4% 中性甲醛溶液中保存。

#### 1.1.2 实验细胞

人胆囊永生化上皮细胞系 HGBEC 和人胆囊癌细胞系 GBC-SD、SGC-996、IH-GB1 均购自中科院上海细胞库;人 T 淋巴细胞购自上海美轩生物科技有限公司。

## 1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养液、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 均购自北京索莱宝科技有限公司,批号分别: 12100、F8250;细胞裂解液购自碧云天生物技术研究所,批号: RG129M; QuantiFast SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit 试剂盒购自德国 QIAGEN 公司,批号: MA-1547; EasySep Human T cell Enrichment 试剂盒购自北京诺为生物技术有限公司,批号: Q0412; 白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2)、白细胞介素-4 (Interleukin-4, IL-4)、白细胞介素-10 (Interleukin-10, IL-10) ELISA 试剂盒均购自帝肯 (上海) 贸易有限公司,批号分别: BE53021、BE53041、BE51001; 干扰素  $\gamma$  (interferon-gamma, IFN- $\gamma$ ) ELISA 试剂盒购自上海广锐生物科技有限公司,批号: R-783; 质粒载体 PGPU6/GFP/Neo 购自上海吉凯化学公司,批号: 190416 L; 萤火虫荧光素酶 (FLUC) 检测试剂盒购自

美国 GeneCopoeia 公司,批号:SF-1322。DM6M 光学显微镜购自德国徕卡公司;Varioskan LUX 多功能酶标仪购自美国赛默飞世尔科技公司;Mastercycler nexus X2 PCR 仪购自德国艾本德公司;CytoFLEX 流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司。YY1 siRNA-1675 序列为 5'-GGGAGCAGAAGCAGGTGC AGT-3'、YY1 siRNA-NC 序列为 5'-AGGGCGAAC GGGCGAGTGG-3',由广州瑞博生物公司合成。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细胞系和细胞转染

细胞培养液由 10% FBS、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素、100 U/mL 青霉素、80% DMEM 培养液组成,常规培养在相对湿度 98%、5%  $\text{CO}_2$ 、37 $^\circ\text{C}$  恒温培养箱中。隔天换液,光学显微镜观察细胞生长情况,胰酶消化传代,取对数生长期 HGBEC 细胞、GBC-SD、SGC-996、IH-GB1 细胞、T 淋巴细胞用于实验。取对数生长期 GBC-SD 细胞,调整细胞密度为每毫升  $2 \times 10^4$  个,接种至 24 孔培养板上,待 GBC-SD 细胞平铺占培养板底部约 50% 时,采用脂质体瞬时转染法,按照 Lipo fectamine<sup>TM</sup> 2000 转染试剂盒说明书,转染试剂:质粒=3  $\mu\text{L}$ :1  $\mu\text{g}$  比例配置质粒-质粒复合物,将 YY1 siRNA-1675、YY1 siRNA-NC(YY1 siRNA 无关序列)、空白质粒(BC 组)转染至 GBC-SD 细胞中,转染 24 h 后弃旧培养液,更换 DMEM 常规培养液,置于荧光显微镜下观察转染情况。qRT-PCR 法测定各细胞中 YY1 mRNA 水平,继续培养用作实验,实验分为:1) BC 组;2) YY1 siRNA-NC 组;3) YY1 siRNA-1675 组。

#### 1.3.2 免疫组化法检测各组织中 YY1 表达

制备常规石蜡切片,进行脱蜡、水化处理,加入 Anti-YY1 抗体(1:100),4 $^\circ\text{C}$  孵育过夜,次日 PBS 清洗后,加入二抗(1:2500),37 $^\circ\text{C}$  孵育 1 h,加链霉素抗生物蛋白-过氧化物酶溶液,37 $^\circ\text{C}$  孵育 40 min 后,进行 DAB 显色,苏木素复染,脱水、透明处理,最后用中性树胶封片。每张切片随机取 5 个视野( $\times 200$ )观察分析。评分标准:(1)按细胞染色:未染色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;(2)按阳性细胞比例: $\leq 10\%$  1 分,11%~50% 2 分,51%~75% 3 分, $> 75\%$  4 分,最终得分=染色得分 $\times$ 阳性细胞比例得分; $\leq 3$  分,为阴性或弱阳性,记作“-”; $> 3$  分,为阳性,记作“+”。

#### 1.3.3 qRT-PCR 法测定各细胞中 YY1 水平

用 200  $\mu\text{L}$  细胞裂解液裂解培养板中各细胞,离

心后取上清液,行逆转录,逆转录体系:RNase-free  $\text{dH}_2\text{O}$  5  $\mu\text{L}$ 、Total RNA 2  $\mu\text{L}$ 、5X gDNA Eraser Buffer 2  $\mu\text{L}$ 、gDNA Eraser 1  $\mu\text{L}$ ,逆转录得 cDNA,以 cDNA 作为扩增模板用于 qRT-PCR 扩增。引物由宝日医生物技术(北京)有限公司合成。YY1 上游引物序列 5'-CCAGAAAACACAAATT-3',下游引物序列 5'-AAAGAAGAGAGAAAAGAGGTT-3'; GAPDH 上游引物序列 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3',下游引物序列 5'-CCATGTAGTTGAGGTCAAT GAAG-3'。扩增体系:反向引物 2  $\mu\text{L}$ 、正向引物 2  $\mu\text{L}$ 、RNase-free  $\text{dH}_2\text{O}$  4  $\mu\text{L}$ 、2X QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ 、cDNA 2  $\mu\text{L}$ 。扩增条件:95 $^\circ\text{C}$  预变性 5 min,(95 $^\circ\text{C}$  10 s、60 $^\circ\text{C}$  34 s、68 $^\circ\text{C}$  30 s) $\times 38$  个循环,72 $^\circ\text{C}$  延伸 10 min。每个样本重复 6 次。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算 YY1 相对 GAPDH mRNA 表达量。

#### 1.3.4 流式细胞仪测定 PD-L1、CD69、CD25 水平

各组 GBC-SD 细胞经胰酶消化后,用 DMEM 培养液调整细胞密度为每毫升  $1 \times 10^5$  个,接种至 anti-CD3 预包被的 96 孔板中,随后加入人 T 淋巴细胞,两者按 GBC-SD:T(1:5)的效靶比混合,常规培养 3 d 后,用 EasySep Human T cell Enrichment 试剂盒收集 T 淋巴细胞,流式细胞仪测定 GBC-SD 细胞 PD-L1 水平、T 淋巴细胞 CD69、CD25 水平。

#### 1.3.5 流式细胞仪测定人 T 淋巴细胞凋亡率

各组 GBC-SD 细胞经胰酶消化后,用 DMEM 培养液调整细胞密度为每毫升  $2 \times 10^5$  个,接种至 anti-CD3 预包被的 24 孔板中,随后加入人 T 淋巴细胞,两者按 GBC-SD:T(1:5)的效靶比混合,常规培养 3 d,收集人 T 淋巴细胞,预冷的乙醇固定 20 min,离心,调整细胞密度为每毫升  $1 \times 10^6$  个,加入 PI 和 AnnexinV-FITC,避光上样,用流式细胞仪检测。

#### 1.3.6 ELISA 检测 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$ 水平

按照“1.3.5”所述培养细胞,取上清液,用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$  水平,操作按照试剂盒说明书执行。

#### 1.3.7 双荧光素酶报告实验验证 YY1 与 PD-L1 靶标关系

##### (1)生物学信息预测及突变载体制备

使用 PROMO 网站预测 YY1 的潜在靶基因,构建 PD-L1 3' UTR 区域含有结合位点及突变的序列 pMIR-Report-PD-L1-3' UTR 质粒,行双酶切后与同

样行双酶切的 pmirGLO 载体连接, 构建野生 pmirGLO-PD-L1-3' UTR-WT (PD-L1-WT) 验证载体及突变型 pmirGLO-PD-L1-3' UTR-Del1-MUT + YY1 siRNA-1675 (PD-L1-Del1-MUT + YY1 siRNA-1675), PD-L1-Del2-MUT + YY1 siRNA-1675, PD-L1-Del3-MUT + YY1 siRNA-1675, PD-L1-Del1、2、3-MUT + YY1 siRNA-1675 组验证载体及对照组 PD-L1-WT + YY1 siRNA-1675。

#### (2) 双荧光素酶报告实验

将 YY1 siRNA-1675 分别与上述构建的载体共转染, 转染 24 h 后, 加入萤火虫荧光素酶 (FLUC) 检测试剂, 15 min 后测定 FLUC 活性值 F, 随后加入海肾荧光素酶 (RLUC) 检测试剂, 10 min 后测定 RLUC 活性值 R, 荧光素酶相对活性用 R/F 比值表示, 每组实验平行 6 次。

#### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以平均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,  $n$  表示样本数, 多组间比较行单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK- $q$  检验; 计数资料用 % 表示, 行卡方检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同胆囊组织中 YY1 表达水平比较

YY1 蛋白主要定位于细胞核, 阳性细胞呈棕黄色, 与正常组织相比, 癌旁组织、胆囊癌组织中 YY1 阳性表达率显著升高 ( $P < 0.05$ ), 与癌旁组织相比, 胆囊癌组织中 YY1 蛋白阳性表达率显著升高 ( $P < 0.05$ )。见图 1、表 1。

### 2.2 各细胞中 YY1 水平比较

收集人胆囊癌 IH-GB1、SGC-996、GBC-SD 细胞和人胆囊上皮 HGBEC 细胞, 检测 YY1 mRNA 水平表达, qRT-PCR 结果显示 YY1 在 IH-GB1、SGC-996、GBC-SD 细胞中相对表达量分别为  $1.57 \pm 0.12$ 、 $1.62 \pm 0.13$ 、 $1.97 \pm 0.15$ , 显著高于在 HGBEC 细胞中相对

表达量  $1.03 \pm 0.11$  ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

### 2.3 转染后 GBC-SD 细胞 YY1 水平比较

转染 siRNA-1675 24 h 后, 置于荧光显微镜下观察转染情况, YY1 siRNA-NC 组和 YY1 siRNA-1675 组均已成功转染且转染效率较高, 42 h 后收集细胞, 提取 RNA, qRT-PCR 结果显示, YY1 siRNA-1675 组 YY1 相对表达量为  $1.37 \pm 0.11$  显著低于 BC 组和 YY1 siRNA-NC 组 YY1 相对表达量为  $1.96 \pm 0.14$ 、 $1.92 \pm 0.16$  ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

### 2.4 转染后 GBC-SD 细胞 PD-L1 水平比较

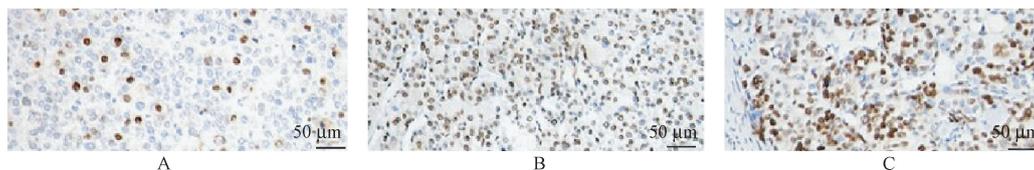
转染 siRNA-1675, 42 h 后收集细胞, 流式细胞仪测定 GBC-SD 细胞 PD-L1 水平, siRNA-1675 组 PD-L1 表达为  $(20.17 \pm 3.16)\%$ , 显著低于 BC 组和 YY1 siRNA-NC 组 PD-L1 表达量为  $(34.18 \pm 5.21)\%$ 、 $(32.30 \pm 5.87)\%$  ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

### 2.5 转染后 GBC-SD 细胞对人 T 淋巴细胞凋亡率的影响

转染 siRNA-1675, 42 h 后收集细胞, 流式细胞仪测定人 T 淋巴细胞凋亡率, BC 组细胞凋亡率为  $(16.7 \pm 1.8)\%$ , YY1 siRNA-NC 组细胞凋亡率为  $(17.2 \pm 1.9)\%$ , YY1 siRNA-1675 组细胞凋亡率为  $(8.0 \pm 1.2)\%$ , 与 BC 组、YY1 siRNA-NC 组相比, YY1 siRNA-1675 组人 T 淋巴细胞凋亡率明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

### 2.6 转染后 GBC-SD 细胞对人 T 淋巴细胞 CD69、CD25 水平的影响

转染 siRNA-1675, 42 h 后收集细胞, 流式细胞仪测定 T 淋巴细胞 CD69、CD25 水平, BC 组 T 淋巴细胞 CD69、CD25 水平为  $(64.21 \pm 8.37)\%$ 、 $(48.51 \pm 5.94)\%$ , YY1 siRNA-NC 组 T 淋巴细胞 CD69、CD25 水平为  $(68.64 \pm 7.95)\%$ 、 $(50.48 \pm 6.50)\%$ , YY1 siRNA-1675 组 T 淋巴细胞 CD69、CD25 水平为  $(89.36 \pm 10.48)\%$ 、 $(68.87 \pm 5.85)\%$ , 与 BC 组、YY1 siRNA-NC 组相比, YY1 siRNA-1675 组 T 淋巴细胞 CD69、CD25 水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。



注: A: 正常胆囊组织; B: 癌旁组织; C: 胆囊癌组织。

图 1 不同胆囊组织中 YY1 蛋白表达情况 (免疫组化染色)

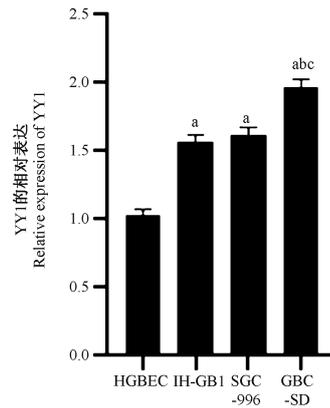
Note. A, Normal gallbladder tissues. B, Paracancer tissues. C, Gallbladder cancer tissues.

Figure 1 Expression of YY1 protein in different gallbladder tissues (Immunohistochemical staining)

表 1 不同胆囊组织中 YY1 表达水平比较

Table 1 Comparison of YY1 expression levels in different gallbladder tissues

组别 Groups	例数(n) Number of cases	YY1 蛋白 YY1 protein		
		+	-	阳性率(%) Positive rate
正常胆囊组织 Normal gallbladder tissues	20	1	19	5.00
癌旁组织 Paracancer tissues	40	12	28	30.00
胆囊癌组织 Gallbladder cancer tissues	40	26	14	65.00
$\chi^2$	/	/	/	22.446
<i>P</i>	/	/	/	0.000

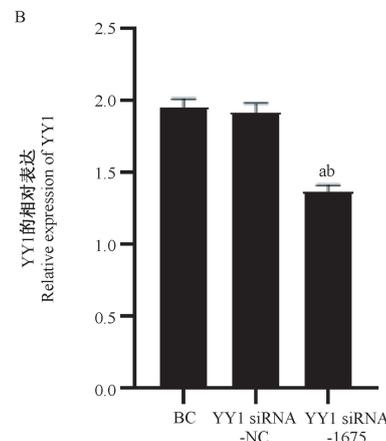
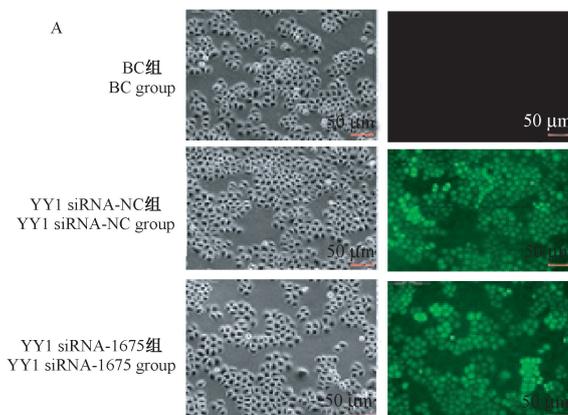


注:与 HGBEC 细胞相比,<sup>a</sup>*P* < 0.05; 与 IH-GB1 细胞相比,<sup>b</sup>*P* < 0.05; 与 SGC-996 细胞相比,<sup>c</sup>*P* < 0.05。

图 2 qRT-PCR 检测 YY1 在各细胞中表达

Note. Compared with HGBEC cells, <sup>a</sup>*P* < 0.05. Compared with IH-GB1 cells, <sup>b</sup>*P* < 0.05. Compared with SGC-996 cells, <sup>c</sup>*P* < 0.05.

Figure 2 qRT-PCR detection of YY1 expression in various cells

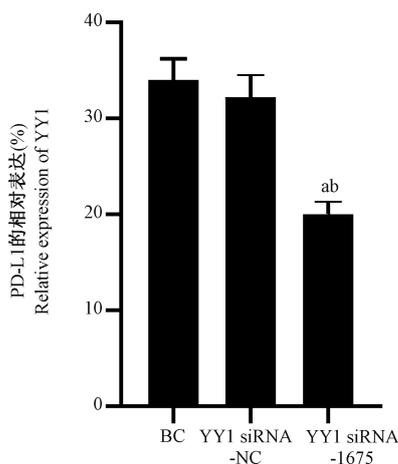


注:A;GBC-SD 细胞转染效率;B:转染后 GBC-SD 细胞 YY1 的相对表达。与 BC 组相比,<sup>a</sup>*P* < 0.05; 与 YY1 siRNA-NC 组相比,<sup>b</sup>*P* < 0.05。

图 3 转染后 GBC-SD 细胞 YY1 水平比较

Note. A, GBC-SD cell transfection efficiency. B, GBC-SD cell relative expression of YY1 after transfection. Compared with BC group, <sup>a</sup>*P* < 0.05. Compared with YY1 siRNA-NC group, <sup>b</sup>*P* < 0.05.

Figure 3 Comparison of YY1 levels in GBC-SD cells after transfection



注:与 BC 组相比,<sup>a</sup>*P* < 0.05; 与 YY1 siRNA-NC 组相比,<sup>b</sup>*P* < 0.05。

图 4 转染后 GBC-SD 细胞 PD-L1 水平比较

Note. Compared with BC group, <sup>a</sup>*P* < 0.05. Compared with YY1 siRNA-NC group, <sup>b</sup>*P* < 0.05.

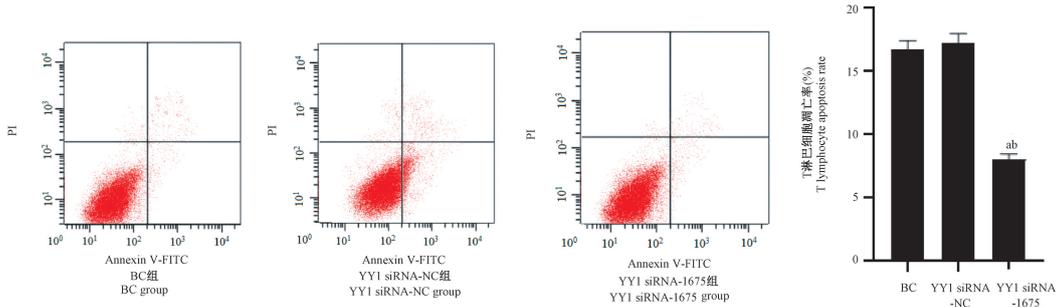
Figure 4 Comparison of PD-L1 levels in GBC-SD cells after transfection

### 2.7 各组细胞上清液中 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$ 水平比较

转染 siRNA-1675, 42 h 后收集细胞, 取上清液, 用 ELISA 测定 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$  水平, 与 BC 组、YY1 siRNA-NC 组相比, YY1 siRNA-1675 组细胞上清液中 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$  水平显著升高 (*P* < 0.05); BC 组和 YY1 siRNA-NC 组细胞上清液中 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$  水平差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 见表 2。

### 2.8 YY1 与 PD-L1 靶标关系

荧光素酶报告实验显示, 与 PD-L1-WT 组比, PD-L1-WT+YY1 siRNA-1675 组荧光素酶相对活性明显降低 (*P* < 0.05); 与 PD-L1-WT+YY1 siRNA-1675 组比, PD-L1-Del1-MUT+YY1 siRNA-1675 组、PD-L1-Del2-MUT+YY1 siRNA-1675 组、PD-L1-Del3-MUT+YY1 siRNA-1675 组、PD-L1-Del1、2、3-MUT+YY1 siRNA-1675 组荧光素酶相对活性显著升高 (*P* < 0.05), 说明 PD-L1 是 YY1 的作用靶点。见图 7。

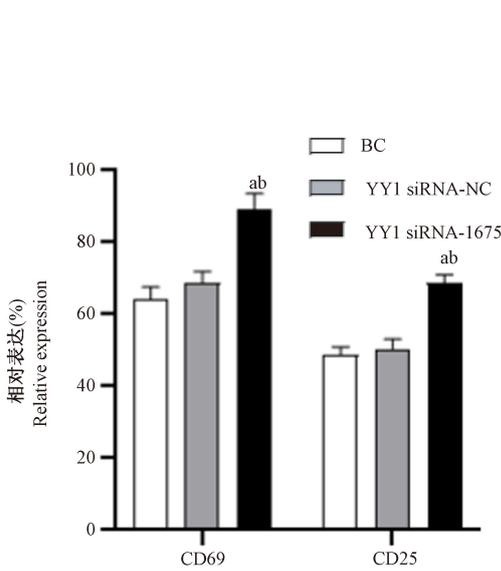


注:与 BC 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 YY1 siRNA-NC 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图 5 转染后 GBC-SD 细胞对人 T 淋巴细胞凋亡率的影响

Note. Compared with BC group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with YY1 siRNA-NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

Figure 5 Effect of GBC-SD cells on human T lymphocyte apoptosis rate after transfection

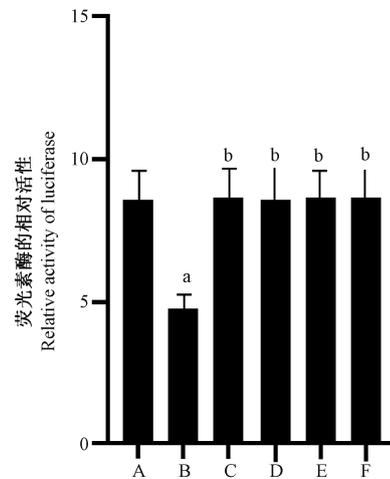


注:与 BC 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 YY1 siRNA-NC 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图 6 转染后 GBC-SD 细胞对人 T 淋巴细胞 CD69、CD25 水平的影响

Note. Compared with BC group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with YY1 siRNA-NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

Figure 6 Effect of GBC-SD cells on CD69, CD25 levels of human T lymphocytes after transfection



注:A:PD-L1-WT 组;B:PD-L1-WT+YY1 siRNA-1675 组;C:PD-L1-Del1-MUT+YY1 siRNA-1675 组;D:PD-L1-Del2-MUT+YY1 siRNA-1675 组;E:PD-L1-Del3-MUT+YY1 siRNA-1675 组;F:PD-L1-Del1、2、3-MUT+YY1 siRNA-1675 组。与 PD-L1-WT 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 PD-L1-WT+YY1 siRNA-1675 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图 7 荧光素酶的相对活性

Note. A, PD-L1-WT group. B, PD-L1-WT + YY1 siRNA-1675 group. C, PD-L1-Del1-MUT + YY1 siRNA-1675 group. D, PD-L1-Del2-MUT + YY1 siRNA-1675 group. E, PD-L1-Del3-MUT + YY1 siRNA-1675 group. F, PD-L1-Del1, 2, 3-MUT + YY1 siRNA-1675 group. Compared with PD-L1-WT group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with PD-L1-WT + YY1 siRNA-1675 group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

Figure 7 Relative activity of luciferase

表 2 各组细胞上清液中 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$  水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Comparison of IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  levels in cell supernatants of each group

组别 Groups	IL-2 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IFN- $\gamma$ (pg/mL)
BC 组 BC Group	527.48±64.83	22.47±5.16	54.14±6.72	615.82±74.08
YY1 siRNA-NC 组 YY1 siRNA-NC Group	571.08±52.19	25.1±6.18	57.01±8.29	644.29±80.82
YY1 siRNA-1675 组 YY1 siRNA-1675 Group	1745.29±204.86 <sup>ab</sup>	88.34±10.19 <sup>ab</sup>	368.27±48.62 <sup>ab</sup>	2854.07±340.16 <sup>ab</sup>

注:与 BC 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 YY1 siRNA-NC 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with BC group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with YY1 siRNA-NC group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

### 3 讨论

目前,临床上治疗胆囊癌主要以手术、化疗、放疗和分子靶向治疗为主,但胆囊癌侵袭性强,术后易复发,导致患者生存率低<sup>[10]</sup>。近几年,随着临床上对肿瘤免疫逃逸机制的深入研究,免疫疗法有望成为治疗肿瘤的新兴疗法<sup>[11]</sup>。YY1 基因位于人 14 号染色体端粒区, q32.2, 其蛋白含有 4 个锌指结构, 可与目的基因结合, 具有激活或抑制目的基因转录的作用, 在多种肿瘤疾病中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。本研究发现, 与正常组织、癌旁组织相比, 胆囊癌组织中 YY1 阳性表达率显著升高, 人胆囊癌细胞 IH-GB1、SGC-996、GBC-SD 细胞较正常人胆囊上皮 HGBC 细胞中 YY1 水平升高, 说明 YY1 与胆囊癌相关, 其中以 GBC-SD 细胞中 YY1 水平最高, 因此后续实验以 GBC-SD 细胞进行。

PD-L1 是负向免疫调节信号, 可抑制肿瘤特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖和免疫活性, 参与免疫逃逸, 临床上 PD-L1 抗体的免疫治疗已经成为抗肿瘤治疗和辅助治疗的重要手段<sup>[13]</sup>。行 PROMO 网站预测发现, YY1 序列 3' UTR 区存在 3 个 PD-L1 结合位点, 推测 YY1 可调控 PD-L1 表达。本研究发现, 转染 YY1 siRNA-1675 后, 转染 YY1 siRNA-1675 后, 与 BC 组、YY1 siRNA-NC 组相比, YY1 siRNA-1675 组 GBC-SD 细胞 YY1 水平降低, 说明 YY1 siRNA-1675 转染成功, YY1 siRNA-1675 组较 BC 组、YY1 siRNA-NC 组 PD-L1 水平随之降低, 说明抑制 YY1 表达, 可下调 PD-L1 水平。进一步荧光素酶报告实验证明 PD-L1 是 YY1 的作用靶点, 说明 YY1 可靶向调控 PD-L1 表达。

PD-L1 是肿瘤免疫研究的热点, 研究发现, PD-L1 在三阴性乳腺癌组织中高表达, 与淋巴结转移、高组织学级别、肿瘤浸润淋巴细胞 PD-1 阳性相关<sup>[14]</sup>。在胶质瘤组织中 PD-L1 阳性表达率显著升高, 可促进 T 细胞凋亡<sup>[15]</sup>。在非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者外周血单核细胞和 T 细胞中 PD-L1 高表达, 通过抑制 T 细胞增殖, 参与 NSCLC 细胞免疫逃逸进程<sup>[16]</sup>。本研究发现, 与 BC 组、YY1 siRNA-NC 组相比, YY1 siRNA-1675 组人 T 淋巴细胞凋亡率降低, 说明下调 PD-L1 能够降低人 T 淋巴细胞凋亡率, 抑制 GBC-SD 细胞免疫逃逸。研究显示, 调节性 T 细胞可分泌 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$  等相关因子, 参与细胞免疫和体液免疫<sup>[17]</sup>。CD25 和

CD69 是 T 细胞活化的标记物, 其水平与 T 细胞活性呈正相关<sup>[18]</sup>。本研究发现, 与 BC 组、YY1 siRNA-NC 组相比, YY1 siRNA-1675 组细胞上清液中 IL-2、IL-4、IL-10、IFN- $\gamma$  水平升高, T 淋巴细胞 CD69、CD25 水平升高, 说明下调 PD-L1 水平可促进 T 细胞活化, 从而分泌细胞因子, 参与免疫进程。

综上所述, 在 GBC-SD 细胞中 YY1、PD-L1 均高表达, YY1 可靶向调控 PD-L1 参与胆囊癌免疫逃逸进程。但是 YY1、PD-L1 在胆囊癌组织中的表达水平及与临床病理特征的关系有待后续实验探究。

#### 参考文献:

- [1] Kishore R, Nundy S, Mehrotra S, et al. Strategies for differentiating gallbladder carcinoma from xanthogranulomatous cholecystitis—a tertiary care centre experience [J]. *Indian J Surg Oncol*, 2017, 8(4): 554–559.
- [2] 吕文才, 邹运, 温爽, 等. 中国胆囊癌发病率及流行趋势分析 [J]. *中华消化外科杂志*, 2019, 18(2): 186–189.
- [3] Zhou TC, Sankin AI, Porcelli SA, et al. A review of the PD-1/PD-L1 checkpoint in bladder cancer: From mediator of immune escape to target for treatment [J]. *Urol Oncol*, 2017, 35(1): 14–20.
- [4] Tanaka T, Kutomi G, Kajiwara T, et al. Cancer-associated oxidoreductase ERO1- $\alpha$  promotes immune escape through up-regulation of PD-L1 in human breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15): 24706–24718.
- [5] Zhan S, Wang T, Ge W, et al. Guest editor: Multiple roles of ring 1 and YY1 binding protein in physiology and disease [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(4): 2046–2054.
- [6] Chen YH, Chung CC, Liu YC, et al. YY1 and HDAC9c transcriptionally regulate p38-mediated mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(3): 514–525.
- [7] 李欢, 王梦杰, 张翔宇, 等. 桥接整合因子 1 通过 c-MYC 途径抑制非小细胞肺癌 A549 细胞中 PD-L1 的表达 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(8): 762–766.
- [8] 陈秋霞, 林羽赫, 张咪, 等. PD-1/PD-L1 信号通路在结直肠癌免疫逃逸及其治疗中作用的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(13): 2133–2138.
- [9] 童玲, 李世君, 张亚男, 等. PD-L1 在胆囊癌组织中的表达及其与临床病理因素的相关性研究 [J]. *临床消化病杂志*, 2018, 30(5): 309–313.
- [10] Liska V, Treska V, Skalicky T, et al. Evaluation of tumor markers and their impact on prognosis in gallbladder, bile duct and cholangiocellular carcinomas—a pilot study [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(4): 2003–2009.
- [11] Bethune MT, Joglekar AV. Personalized T cell-mediated cancer immunotherapy: progress and challenges [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, 48(1): 142–152.

(下转第 120 页)

- regulate MAPK1 expression in cervical cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 152.
- [13] 周原世, 高泽玮, 黄荣菊, 等. 恶性肿瘤发生发展中核仁 RNA 宿主基因 15 的作用及机制 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2019, 33(10): 1029-1032.
- [14] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1): 5-29.
- [15] Feng Z, Wen H, Bi R, et al. Prognostic impact of the time interval from primary surgery to intravenous chemotherapy in high grade serous ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 141(3): 466-470.
- [16] Chen S, Wang LL, Sun KX, et al. The role of the long non-coding RNA *TDRG1* in epithelial ovarian carcinoma tumorigenesis and progression through miR-93/RhoC pathway [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(2): 225-234.
- [17] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
- [18] Sun R, Sun X, Liu H, et al. Knockdown of lncRNA *TDRG1* inhibits tumorigenesis in endometrial carcinoma through the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 10863-10872.
- [19] Chen S, Wang LL, Sun KX, et al. *TDRG1* enhances tumorigenicity in endometrial carcinoma by binding and targeting VEGF-A protein [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(9): 3013-3021.
- [20] Nasrollahzadeh-Khakiani M, Emadi-Baygi M, Schulz WA, et al. Long noncoding RNAs in gastric cancer carcinogenesis and metastasis [J]. *Brief Funct Genomics*, 2017, 16(3): 129-145.
- [21] 张永海. 汉黄芩素体外对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、迁移和侵袭的实验性研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(2): 89-95.
- [22] Ma Y, Xu XL, Huang HG, et al. LncRNA *TDRG1* promotes the aggressiveness of gastric carcinoma through regulating miR-873-5p/HDGF axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109425.
- [23] 胡增涛, 徐书婉, 夏浩明, 等. KCNQ10T1 在肿瘤中的表达及意义 [J]. *实用药物与临床*, 2019, 22(11): 1226-1229.
- [24] Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments [J]. *Lancet*, 2017, 389(10066): 299-311.
- [25] Hu X, Mu Y, Wang J, et al. LncRNA *TDRG1* promotes the metastasis of NSCLC cell through regulating miR-873-5p/ZEB1 axis [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 10: 1002

[收稿日期]2020-02-17

## (上接第 36 页)

- [12] Wang W, Li D, Sui G. YY1 is an inducer of cancer metastasis [J]. *Crit Rev Oncog*, 2017, 22(1-2): 1-11.
- [13] Prestipino A, Emhardt AJ, Aumann K, et al. Oncogenic JAK2 V617F causes PD-L1 expression, mediating immune escape in myeloproliferative neoplasms [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(429): 7729-7741.
- [14] 张伟, 徐国祥, 李佳嘉, 等. PD-1/PD-L1 在三阴性乳腺癌中的表达及其意义 [J]. *中华病理学杂志*, 2017, 46(1): 20-24.
- [15] 李巧转, 李娴. PD-L1 在人胶质瘤中的表达及其对肿瘤内浸润性 T 细胞凋亡的影响 [J]. *重庆医学*, 2018, 47(1): 37-39, 42.
- [16] Kleffel S, Posch C, Barthel SR, et al. Melanoma cell-intrinsic PD-1 receptor functions promote tumor growth [J]. *Cell*, 2015, 162(6): 1242-1256.
- [17] Zhang Y, Wang Y, Li MQ, et al. IL-25 promotes Th2 bias by upregulating IL-4 and IL-10 expression of decidual  $\gamma\delta$ T cells in early pregnancy [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2): 1855-1862.
- [18] Wang Q, He H, Chen D, et al. Hepatic stroma-educated regulatory DCs suppress CD8<sup>+</sup> T cell proliferation in mice [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(55): 93414-93425.

[收稿日期]2020-03-20